

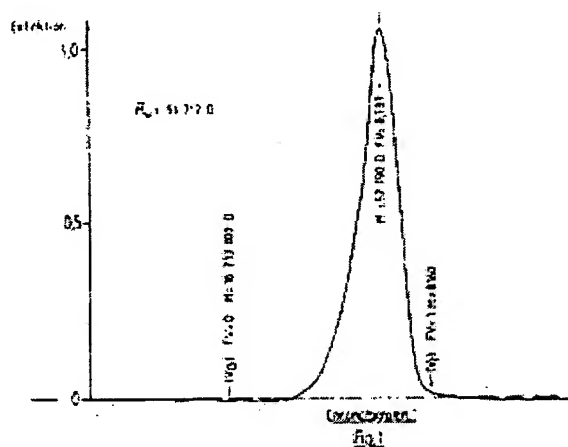
## Method for purifying and modifying polymerised haemoglobin

**Patent number:** DE3841105  
**Publication date:** 1990-06-13  
**Inventor:** BARNIKOL WOLFGANG KARL RICHARD (DE)  
**Applicant:** BARNIKOL WOLFGANG KARL RICHARD (DE)  
**Classification:**  
- international: **C07K14/805**; A61K38/00; **C07K14/795**; A61K38/00;  
(IPC1-7): C07H1/02; C07K15/22  
- european: C07K14/805  
**Application number:** DE19883841105 19881207  
**Priority number(s):** DE19883841105 19881207

**Report a data error here**

### Abstract of DE3841105

The invention relates to a method for purifying and modifying polymerised haemoglobin, which is characterised in that the highly polymeric haemoglobin which has been obtained as precipitate in the crosslinking reaction is redissolved after the precipitate has been washed. The method according to the invention provides high molecular weight highly pure polymeric product with an efficient and simple purification and fractionation method.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 3841 105 A 1

51 Int. Cl. 5:  
C07K 15/22  
C 07 H 1/02

21 Aktenzeichen: P 38 41 105.9  
22 Anmeldetag: 7. 12. 88  
43 Offenlegungstag: 13. 6. 90

DE 3841 105 A 1

71 Anmelder:  
Barnikol, Wolfgang Karl Richard, Prof. Dr.Dr., 6500  
Mainz, DE

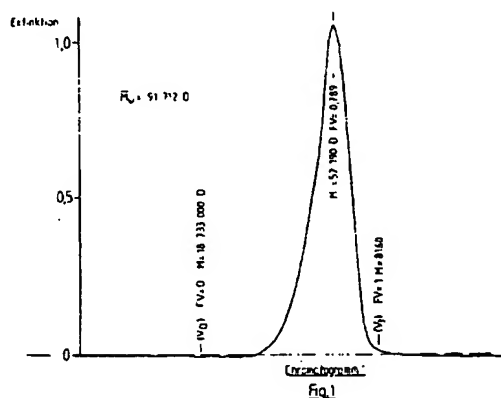
74 Vertreter:  
Ratzel, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 6800  
Mannheim

72 Erfinder:  
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Aufreinigung und Modifikation von polymerisiertem Hämoglobin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung und Modifikation von polymerisiertem Hämoglobin, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das als Präzipitat in der Vernetzungsreaktion gewonnene hochpolymere Hämoglobin nach Waschen des Präzipitats wieder in Lösung gebracht wird. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert hochmolekulares, hochreines Polymerprodukt mit einer effektiven und einfachen Reinigungs- und Fraktionierungsmethode.



DE 3841 105 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung und Modifikation von polymerisiertem Hämoglobin.

Chemische Modifikationen von Hämoglobin, z.B. Veränderung der Sauerstoff-Affinität oder Polymerisation des Moleküls, werden unter anderem vorgenommen, um beim Menschen die Sauerstoff-Transport-Funktion zu unterstützen.

Bekanntlich können entsprechende Lösungen im Katastrophenfall, also beispielsweise bei einem Operationszwischenfall mit schwer zu beherrschenden Blutungen, bei Unfällen unter Blutverlust oder für den Fall eines Infektionsrisikos (Hepatitis, AIDS=Aquiriertes Immun-Defekt-Syndrom) als Ersatz für eine momentan nicht verfügbare passende Blutkonserve infundiert werden; dies gilt auch dann, wenn ein Mensch z.B. in den genannten Fällen in einem Volumen-Mangel-Schock geraten ist. Ein Sauerstoff-transportierender Blutersatz ist, gegenüber einer Blutkonserve, auch für den Fall günstiger, wenn die Gefahr einer immunologischen Überreaktion besteht.

Es ist möglich, daß eine sauerstoffübertragende Blutersatzlösung einen Volumen-Mangel-Schock eher durchbrechen kann, als eine Blutkonserve, da die Erythrozyten bekanntlich in der Konserve versteift sind und dadurch eine verringerte Kapillardurchgängigkeit aufweisen. Ferner ist zu erwarten, daß auch chronische Durchblutungsstörungen (beispielsweise koronare, cerebrale und periphere) mit Hilfe geeigneter Polyhämoglobininlösungen wirksam bekämpft werden können. Zudem lassen sich Sauerstoff-Mangelzustände ohne Durchblutungsverminderung, z.B. chronische Anämien mit solchen Lösungen bekämpfen.

An Tierversuchen ist gezeigt worden, daß mit sauerstoffübertragenden Blutersatzlösungen ein Volumen-Mangel-Schock wirksamer bekämpft werden kann, als mit einfachen Plasmaexpandern (übersichtliche Literaturstelle hierzu: R. Pabst, Med.Klin. 72 (1977), Seiten 1555 bis 1562).

Zur Herstellung sauerstofftragender Blutersatzmedien sind bereits verschiedene Wege beschritten, nämlich

1. Verwendung von Emulsionen von Fluorkohlenwasserstoffen, in welchen der Sauerstoff sehr gut löslich ist (übersichtliche Literaturstelle hierzu: Hirlinger et al., Anästhesist 31 (1982), Seiten 660 bis 666).
2. Die Mikroverkapselung konzentrierter Hämoglobininlösungen in Phospholipid-Vesikeln (Literaturstelle hierzu: Gaber et al., Encapsulation of Hemoglobin in Phospholipid Vesicles; Preparation and Properties of a Red Cell Surrogate in "The Red/Cell Sixth Ann Arbor Conference", G.J. Brewer (Herausgeber), Alan R. Liss, Inc., New York, 1984, Seiten 179 bis 190, sogenannte "künstliche Erythrozyten").
3. Herstellung geeigneter Hämoglobininlösungen, auch unter kovalenter Bindung des Hämoglobins an Dextrane.

Die DE-OS 24 17 619 beschreibt beispielsweise polymerisiertes, verknüpftes Hämoglobin als Plasmaprotein-Ersatz, wobei dicarboxylidat-verknüpftes Hämoglobin hergestellt wird.

Die DE-OS 27 14 252 beschreibt pyridoxalphosphat-verknüpftes Hämoglobin.

Die DE-OS 30 29 307 betrifft ein Blutersatzmittel, hergestellt durch kovalente Verknüpfung von Polysaccharid, beispielsweise Dextran, mit zellfreiem Hämoglobin.

Die BE-PS 8 38 933 beschreibt ein wasserlösliches, verknüpftes, polymerisiertes Hämoglobin, das hergestellt wird durch Umsetzung freien Hämoglobins mit einem polifunktionellen verknüpfenden Agens und anschließendem Abstoppen der Reaktion mit einem inaktivierenden Mittel. Es wird ein polymerisiertes Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 64 000 bis 10 000 000 Dalton erhalten.

Die US-PS 40 01 401 betrifft Poly-Hämoglobin, ein verknüpftes Hämoglobin, als Blutersatz und Plasmaexpander, mit einem Molekulargewicht von 64 000 bis 10 000 000 Dalton. Als verknüpfende Agenzien werden Glutardialdehyd, Hexamethyldiisocyanat oder Butadiendiepidoxid verwendet.

EP 85 106 057.4 betrifft ein Verfahren, aus extrem hohen Konzentrationen extrem hochmolekularer, kompakte lösliche Polymere des Hämoglobins herzustellen.

In P 37 14 351.4 wird dieses Verfahren insofern vereinfacht, als direkt Erythrozyten Verwendung finden können und das Vernetzungsmittel nicht mehr gelöst in einer Lipid-Phase zugesetzt werden muß.

Diese bekannten Verfahren können zumindest in gewisser Hinsicht nicht befriedigen.

So ist es beispielsweise beim Verfahren der US-PS 40 01 401 erforderlich, Amine zur Verhinderung der Entstehung unlöslicher Produkte vor Zugabe von Verknüpfungsmitteln zuzugeben.

Bei Anwendung von Fluorkohlenwasserstoffen wurden gewebliche Reaktionen festgestellt (siehe oben bei Hirlinger et al.).

Mit Hämoglobin-Vesikeln gelangen erst jetzt die ersten Tierversuche (Science 230 (1985), 1165 – 1168).

Im letzteren Fall besteht die Gefahr einer Lipid-Überbelastung des Organismus durch vesikelbildende Lipide. Die besten Aussichten auf eine erfolgreiche Anwendung sind Hämoglobin-Lösungen einzuräumen.

Jedoch stehen einer routinemäßigen klinisch-praktischen Nutzung von Hämoglobininlösungen bisher jeweils mehr oder weniger verschiedene Probleme entgegen, nämlich:

I) Erhöhung der Sauerstoff-Hämoglobin-Affinität, das heißt der Halbsättigungsdruck (P 50) nimmt ab. Dadurch wird die Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe erschwert. Dies tritt ausgeprägt bei der Bindung des Hämoglobins an Dextran auf. Um das zu vermeiden, hat man entsprechende Effektoren (beispielsweise Pyridoxalphosphat).

II) Zu geringe Verweildauer des künstlichen Blutersatzes im Organismus. Ausscheidung über die Nieren. Beispielsweise betrug die Halbwertszeit der künstlichen Erythrozyten nur 5,8 Stunden. Bei den "extrazellulären" Hämoglobininlösungen hat man versucht, die Ausscheidung durch die Polymerisation zu verhindern. Auch die Verweildauer der "extrazellulären" Hämoglobininlösungen ist nicht groß genug.

III) Störungen des onkotischen Milieus. Dadurch kann es zum Volumenverlust kommen (Volumen-Mangel-Schock). Dieser Effekt tritt auf, wenn das Molekulargewicht des Blutersatzes mit dem der Plasmaproteine vergleichbar ist. Hierdurch ist man mit der Dosierung des künstlichen Blutersatzes nicht frei, sondern muß auf die onkotischen Ver-

hältnisse Rücksicht nehmen. Dadurch, daß im Säugetierblut sich der Sauerstoff-bindende Blutfarbstoff in den Zellen befindet, ist der Hb-Gehalt und damit der Sauerstoff-Gehalt des Blutes vom osmotischen Druck entkoppelt. Bei den niederen Tieren geschieht dies durch das extrem hohe Molekulargewicht der Sauerstoff-Binde-Proteine.

IV) Zu hohe Viskosität der Hämoglobin-Lösung. Diese Erscheinung tritt vor allem auf, wenn eine Polymerisation zu Kettenmolekülen erfolgt. Man kann die erhöhte Viskosität vermeiden, wenn man kompakt polymerisiert (siehe unter 4).

V) Will man bei Nicht-Entkopplung des osmotischen Druckes das osmotische Milieu nicht stören, so kommt es zur Herzbelastung durch Hypervolämie.

VI) Übermäßige Reaktion des Retikulo-Endothelialen Systems: Diese fand sich insbesondere bei Verwendung der Fluorocarbone.

VII) Nieren und Leberschädigung Ein Nierenschock tritt vor allem auf, wenn stromahaltige Hämoglobinslösungen verwendet wurden. Seit man die Lösungen ultrafiltriert, wurde eine Nierenschädigung nicht mehr beobachtet. Leberschädigungen wurden mit Hilfe des Plasma-Transaminase-Spiegels indiziert.

VIII) Antigene Wirkung Dazu wurde neuerdings in Homolog-Versuchen an Ratten gezeigt, daß natives Hämoglobin nicht antigen wirksam ist und daß die Polymerisation mit Glutardialdehyd die Antigenität nicht erhöht (J. Artificial Organs 9 (1986), 179 – 182). In der gleichen Arbeit wird gezeigt, daß menschliches natives Hämoglobin bei Ratten wenig antigen wirkt und daß der Effekt durch die Polymerisation geringgradig verstärkt wird.

IX) Toxische Wirkung (pyrogen, vasokonstriktorisch).

X) Überlastung des Organismus mit Lipiden. Diese Komplikation tritt bei der Verwendung mikrokapselter Hämoglobin-Lösungen sowie Fluorcarbonen auf.

I) bis IV) stellen physiko-chemische Probleme dar, V) bis X) dagegen biologische.

Aus den Darlegungen geht hervor, insbesondere aus den Punkten II, III und V, daß es günstig ist, Hämoglobin zu möglichst großem Polymerisationsgrad zu verknüpfen. Jedoch sollte das Polymere dabei möglichst kompakt sein und kein durchspültes Faden-Molekül, um bei möglichst geringer Viskosität des Plasmas eine möglichst große Konzentration des Sauerstoffträgers applizieren zu können.

Das Problem der Verknüpfung des Hämoglobins zu kompakten löslichen Riesen-Molekülen kann als gelöst gelten (siehe EP 85 106 057.4 und P 37 14 351.4). Jedoch besteht hierbei eine sehr breite Verteilung des Molekulargewichtes. Wie wir gezeigt haben, weisen diese Polymeren eine stark überproportionale Zunahme der Viskosität mit der Konzentration auf (W.K.R. Barnikol, O. Burkhard, Adv. Biol. Med. 1988, im Druck).

Das Einsteinsche Viskositätsgesetz besagt nun, daß Kugeln in einer Flüssigkeit, und zwar unabhängig von ihrem Radius, eine minimale Viskosität aufweisen. Daher wäre es zur Verringerung der Viskosität extrem wichtig, möglichst einheitliche Polymere wie sie im übrigen auch in der Natur (Regenwurm) zu finden sind, herstellen zu können.

Dann könnte das Molekulargewicht des Sauerstoff-

trägers sehr hoch gemacht werden, damit die Forderung nach einem vernachlässigbaren kolloidosmotischen Druck zu erfüllen ist (siehe III). Tatsächlich kann durch Abtrennung der Monomeren und Oligomeren mittels Ultrafiltration die Viskosität erheblich gesenkt werden (Barnikol, Burkhard siehe oben).

Jedoch bedeutet die Ultrafiltration einen zusätzlichen aufwendigen technischen Prozeß, der die Denaturierung des empfindlichen Moleküls, insbesondere jedoch die vermehrte Bildung des Met-Hämoglobins, welches keinen Sauerstoff mehr zu binden vermag, steigert. Zudem verringert die Ultrafiltration erheblich die Ausbeute.

Die Verfahren des Standes der Technik besitzen somit die Nachteile aufwendiger technischer Prozeßführung, Denaturierung des empfindlichen Moleküls, Bildung von unerwünschten Nebenprodukten, Heterogenität der Molekulargewichtsverteilung, unzureichenden Polymerisationsgrad, Verunreinigung mit Monomeren und Oligomeren und aufwendige Reinigungsverfahren.

Demgegenüber liegt vorliegender Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Aufreinigung von modifiziertem, insbesondere polymerisiertem Hämoglobin zu liefern, das ein stabiles, hochvernetztes, möglichst einheitliches Hämoglobin mit hoher Sauerstofftransportfähigkeit und geringem Met-Hämoglobin-Gehalt liefert.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß nach Ausfällung während der Vernetzungsreaktion sich die Hochpolymeren nach einigen Stunden wieder praktisch vollständig lösen.

Die obige Aufgabe wird erfindungsgemäß beim Verfahren der eingangs genannten Gattung dadurch gelöst, daß das als Präzipitat in der Vernetzungsreaktion gewonnene hochpolymere Hämoglobin nach Waschen des Präzipitats wieder in Lösung gebracht wird.

Besondere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, daß das Hämoglobin durch Vernetzung polymerisiert wird, daß die Polymeren unlösliche Präzipitate bilden, daß durch das Auswaschen der vernetzten Präzipitate eine Abtrennung der niedermolekularen Reaktanten und somit eine Reinigung erfolgt, daß eine Abtrennung der Monomeren und Oligomeren erfolgt.

Weitere besondere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, daß die gewünschten Polymere nahezu quantitativ abgetrennt werden, daß die löslichen Polymeren durch Zusatz geeigneter Reagenzien noch modifiziert, insbesondere stabilisiert werden, daß die Verknüpfungsstellen modifiziert, insbesondere stabilisiert werden, und daß durch fraktioniertes Lösen unmittelbar Polymere verschiedener Molekulargewichte abgetrennt erhalten werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Herstellung hochpolymerer möglichst einheitlicher Produkte. Es ermöglicht weiterhin eine einfache und wirksame Abtrennung der Monomeren und Oligomeren sowie anderer Reaktanten vom Polymeren.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden schon mit der Polymerisationsreaktion weitgehend einheitliche, hochmolekulare und kompakte lösliche Hämoglobinpolymeren erhalten.

Bei den Polymeren, erhalten gemäß dem Verfahren

der Erfindung, ist der kolloidosmotische Druck klein, das Produkt sehr rein und die Ausbeute sehr hoch.

Durch das Auswaschen der vernetzten Präzipitate ist eine Abtrennung der niedermolekularen Reaktanten und somit eine effektive und einfache Reinigung möglich.

Außerdem tritt kein Verlust der gewünschten Polymeren auf. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß durch fraktioniertes Lösen, ohne zusätzliche aufwendige Fraktionierverfahren, Polymere verschiedener Molekulargewichte erhalten werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist besondere Vorteile zur Verbesserung und Verbilligung geeigneter Sauerstofftransportierender Hämoglobinlösungen auf. Die Verbesserung besteht in der technisch einfachen Entfernung der unbrauchbaren Reaktanten sowie etwaiger toxischer Substanzen (siehe IX), insbesondere des nichtpolymerisierten monomeren Hämoglobins, welche notwendigerweise nach der Vernetzungsreaktion noch vorhanden sind. Eine Ultrafiltration zwecks Reinigung und Abtrennung des Monomeren mit unvermeidlicher Verringerung der Ausbeute kann unter Umständen entfallen. Das bedeutet Verbilligung. Eine Verbesserung besteht ferner in der Gewinnung einheitlicher Polymerer, deren Viskosität geringer ist als die uneinheitlicher Produkte. Der Prozeß des Wiederlösen gibt zudem die Möglichkeit, falls erforderlich, das vernetzte Produkt weiter zu stabilisieren. Zum Beispiel entstehen bei der Vernetzung mit Glutardialdehyd als Verknüpfungsstellen mit den Aminogruppen des Hämoglobins Schiff'sche Basen, welche bekanntermaßen instabil sind. Sie können während des Löseprozesses reduktiv stabilisiert werden.

Eine Verbesserung ist ferner die Möglichkeit, den Löseprozeß fraktioniert durchführen zu können. So lassen sich auf einfache Weise verschieden hohe Molekulargewichte herstellen und somit die Verweildauer der Präparate nach Bedarf einstellen (Kurzzeit- und Langzeitpräparate, siehe II). Durch fraktioniertes Lösen verringert sich noch einmal die Uneinheitlichkeit mit dem günstigen Effekt auf die Viskosität.

Das Wesen der vorliegenden Erfindung wird nun anhand der folgenden Ausführungsbeispiele, welche bevorzugte Ausführungsformen zeigen, weiterhin erläutert. Dabei geben die Fig. 1 bis 5 die Chromatogramme 1 bis 5 aus den Beispielen 1 und 2 wieder.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren zur Aufreinigung, Modifikation, insbesondere zur Polymerisation des Hämoglobins, führt man die Reaktion in vitro mit intakten Erythrozyten durch. Dabei kann mittels an sich bekannter Agenzien die Sauerstoff-Affinität verändert werden. Die Modifikation, insbesondere die Polymerisation des Hämoglobins kann durch Einwirken polifunktionaler Agenzien vorzugsweise in isotonomischer Lösung durchgeführt werden. Als Polymerisationsmittel kann beispielsweise Glutardialdehyd eingesetzt werden. Als Ausgangsmaterial können Tier-Erythrozyten, insbesondere Rinder-Erythrozyten verwendet werden. Beim erfindungsgemäßen Verfahren fällt das gewünschte polymere Produkt zunächst als Präzipitat an, welches sich danach in Stunden erst langsam auflöst. Dies gibt die Möglichkeit einer effektiven und einfachen Reinigung und Fraktionierung des Polymeren.

#### Beispiel 1

Polymerisation und fraktionierte Lösung im Liter-

maßstab, Elimination der Monomeren und Oligomeren.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 22°C (Raumtemperatur). Es wurden 100 ml frisches, heparinisierendes Aderlaßblut 10 Minuten lang bei 2000 g zentrifugiert, mit einer Elektrolytlösung "Biku-Lösung" ad 100 ml resuspendiert. Dreimal wurden nun mit dieser Biku-Lösung die Erythrozyten gewaschen, indem jeweils nach Suspension mit 2000 g 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde.

Die "Biku-Lösung" enthält 7,31 g/l NaCl, 0,335 g/l KCl, 1,680 g/l NaHCO<sub>3</sub> und etwa 0,2 g/l NaN<sub>3</sub>.

Es wurde nun eine Erythrozytensuspension hergestellt mit 270 ml Biku-Lösung, 1,25 g NaCl und 30 g gepackten Erythrozyten. In einem 1 l Becherglas wurde mit einem Magnetprüher bei mittlerer Geschwindigkeit (etwa 100 Umdrehungen pro Minute) diese Suspension gerührt.

Es wurden 400 mg fein gemörstertes Diisocyanatocyclohexan (DIC) in einem 30 ml-Becherglas mit 20 ml Biku-Lösung versetzt und mittels Magnetprüher bei größtmöglicher Rührgeschwindigkeit genau 10 min. dispergiert, dann 15 ml dieser Suspension in die Erythrozyten-Suspension eingetropft.

Nach 50 Minuten wurde die Erythrozytensuspension in vier 75 ml/Zentrifugengläser eingefüllt und 10 Minuten lang bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zentrifugat wieder zum Ausgangsvolumen (= 270 ml) mit aqua dest. aufgefüllt. Die Hämolysen der Erythrozyten wurde durch Umrühren mit einem Glasstab beschleunigt. Die so erhaltene Lösung wurde wieder in ein 1 l-Becherglas gefüllt und mit einem Magnetprüher mittlerer Drehgeschwindigkeit (etwa 100 Umdrehungen pro Minute) gerührt.

Nach 30 Minuten wurde eine Probe von 1,5 ml entnommen und 10 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand durch ein 0,22 µm/Filter filtriert, die Konzentration mit der Cyan-Hämoglobin-Methode bestimmt, die Probe auf eine Konzentration von 1 g/dl verdünnt und die Molekulargewichtsverteilung mit der Gelpermeation bestimmt (Chromatogramm 1). Methodik siehe unten.

Nach 24 Stunden wurde eine zweite Probe entnommen und der Überstand chromatographiert (Chromatogramm 2). Der gesamte Rest-Ansatz wurde 40 Minuten bei 15000 g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, ein Teil des Niederschlags (= 8,79 g) in 9,53 ml Wasser suspendiert in einem 50 ml-Becherglas und mittels Magnetprüher langsam gerührt. Nach weiteren 24 Stunden wurde eine Probe genommen und wiederum der Überstand chromatographiert (Chromatogramm 3).

#### Beispiel 2

Polymerisation und fraktionierte Lösung unter reduktiver Stabilisation der Verknüpfungsstelle im Milliliter-Ansatz.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 22°C (Raumtemperatur). Es wurden 12 ml frisches heparinisierendes Venenblut, wie in Beispiel 1 beschrieben, von Plasma und Leukozyten getrennt und mit "Biku-Lösung" dreimal gewaschen.

Dann wurde eine Erythrozytensuspension mit 0,2 g NaCl, 43,2 Biku-Lösung (siehe Beispiel 1) und 4,80 ml gepackten Erythrozyten hergestellt, davon wurden 47,75 ml in einem 100 ml Becherglas mit einem Magnetprüher versehen und langsam (60 Umdrehungen pro Minute) gerührt. 0,1 ml einer 25%igen Glutardialdehyd-Lösung wurden 1 : 24 mit Biku-Lösung verdünnt und

von der entstandenen 1%igen Lösung 2,388 ml zu der Erythrozytensuspension getropft. Nach 18 Minuten wurde die Suspension in Zentrifugengläser umgefüllt und 6 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, die gepackten Erythrozyten bis zum ursprünglichen Volumen (= 47,75 ml) mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit einem Glasstab bis zur vollständigen Hämolyse gerührt. Die Lösung wurde darauf für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. 1/3 des Zentrifugates wurde erneut in Wasser zum Endvolumen von 14,78 ml resuspendiert (Probe a), und 1/3 des Zentrifugates wurde in einer frisch hergestellten Lösung von 150 mg NaCNBH<sub>3</sub> auf 25 ml H<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 15,87 ml resuspendiert (Probe b).

Nach 24 Stunden wurden Proben, wie in Beispiel 1 beschrieben, entnommen, präpariert und chromatographiert: Chromatogramm 4 zeigt Probe a. Chromatogramm 5 zeigt Probe b.

#### Chromatographie

Die Analyse der Molekulargewichtsverteilung und die Bestimmung des Gewichtsmittels des Molekulargewichts (MW) erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie. Es fand Sephacryl 400 HR-Gel (Deutsche Pharmacia, Freiburg, BR Deutschland) Verwendung. Säule: Höhe 80 cm, Durchmesser 1 cm, Eluatfluß 6,3 ml/min, Detektion photometrisch: 425 nm.  $FV = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ ,  $V_e$  = Elutionsvolumen der Probe,  $V_o$  = Totvolumen, bestimmt mit Dextran Blau (Deutsche Pharmacia, Freiburg, BR Deutschland);  $V_t$  = Totalvolumen, bestimmt mit Glutathion. FV und der Logarithmus des Molekulargewichts stehen in linearer Beziehung zueinander. FV wurde mit globulären Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Alle Lösungen wurden vor der Chromatographie über 0,22 µm/Filter filtriert.

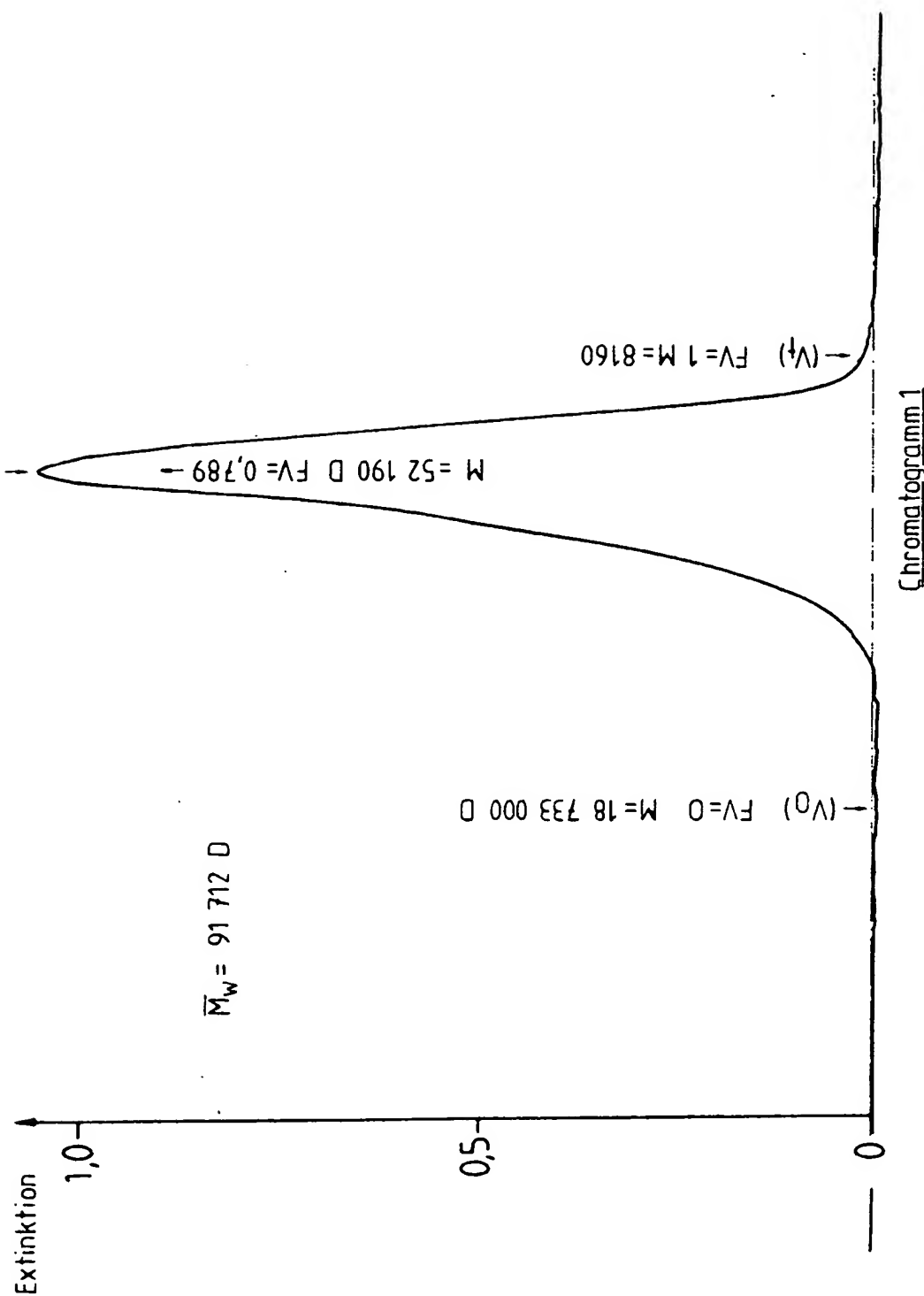
#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufreinigung und Modifikation von polymerisiertem Hämoglobin, **dadurch gekennzeichnet**, daß das als Präzipitat in der Vernetzungsreaktion gewonnene hochpolymere Hämoglobin nach Waschen des Präzipitats wieder in Lösung gebracht wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hämoglobin durch Vernetzung polymerisiert wird.
3. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymeren unlösliche Präzipitate bilden.
4. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch das Auswaschen der vernetzten Präzipitate eine Abtrennung der niedermolekularen Reaktanten und somit eine Reinigung erfolgt.
5. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Abtrennung der Monomeren und Oligomeren erfolgt.
6. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gewünschten Polymere nahezu quantitativ abgetrennt werden.
7. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die löslichen Polymeren durch Zusatz geeigneter Reagenzien noch modifiziert, insbesondere stabilisiert werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfungsstellen modifiziert, insbesondere stabilisiert werden.

zeichnet, daß die Verknüpfungsstellen modifiziert, insbesondere stabilisiert werden.

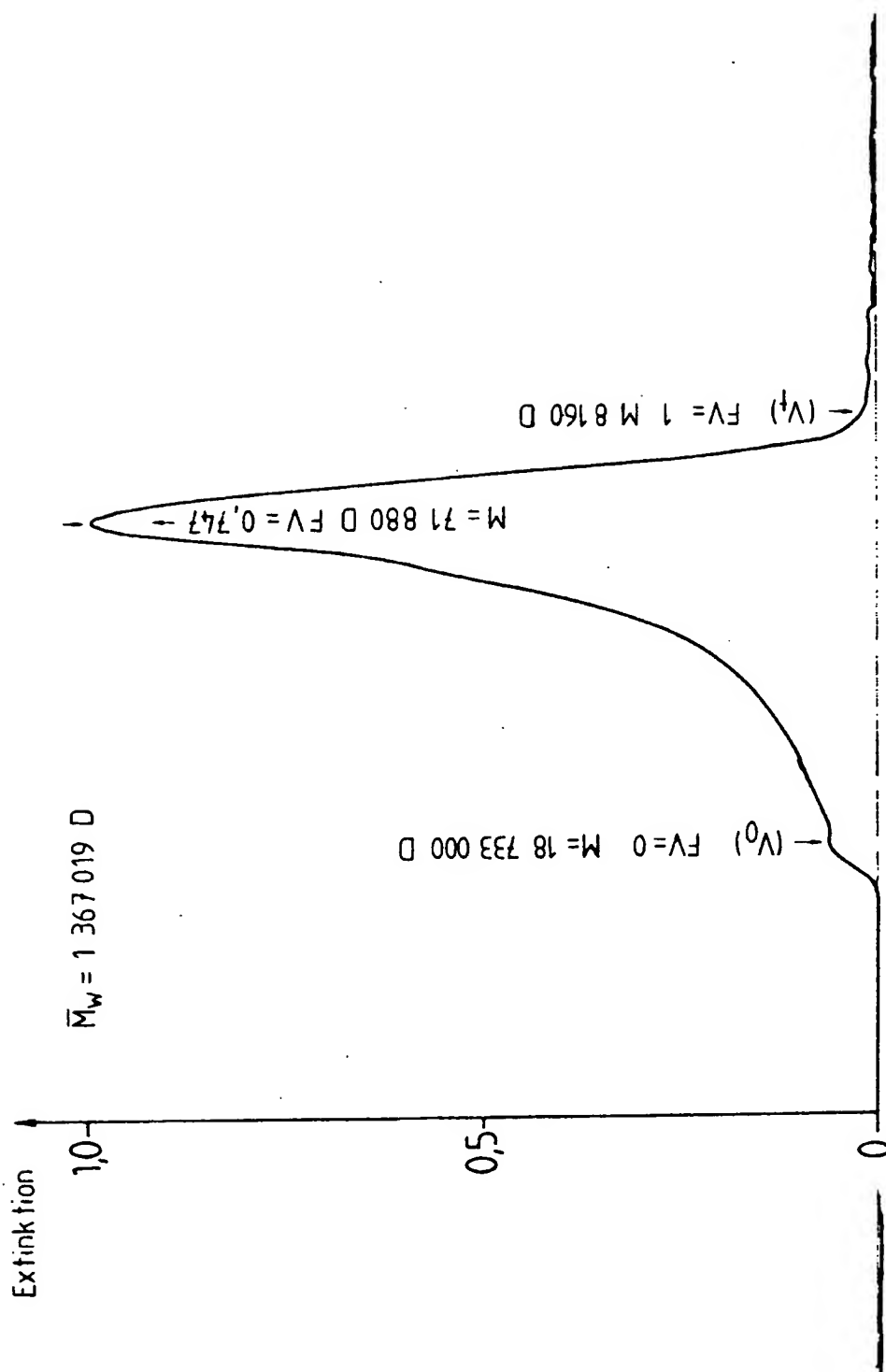
9. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß durch fraktioniertes Lösen unmittelbar Polymere verschiedener Molekulargewichte abgetrennt erhalten werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen



Chromatogramm 1

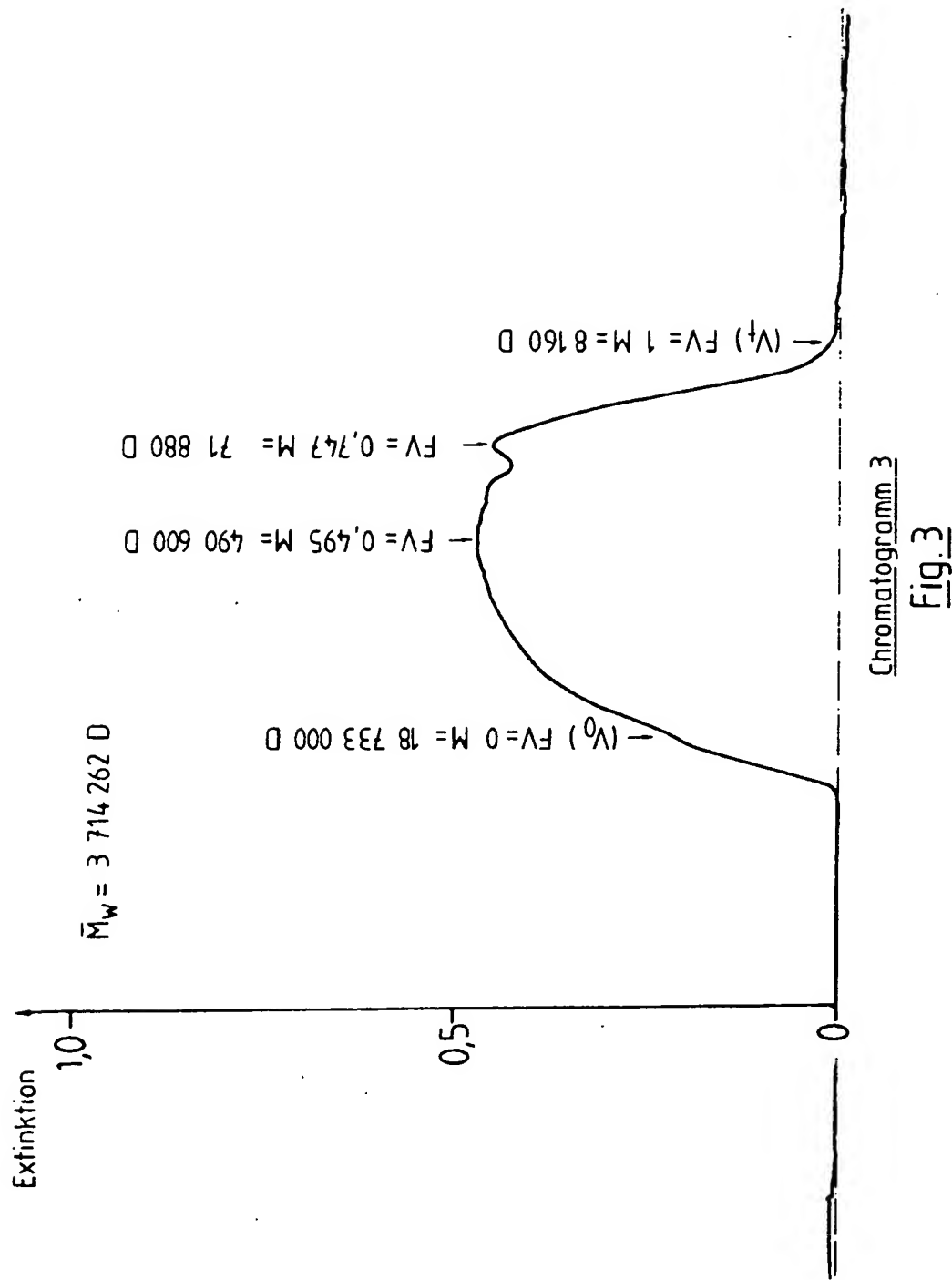
Fig. 1



Chromatogramm 2

Fig. 2





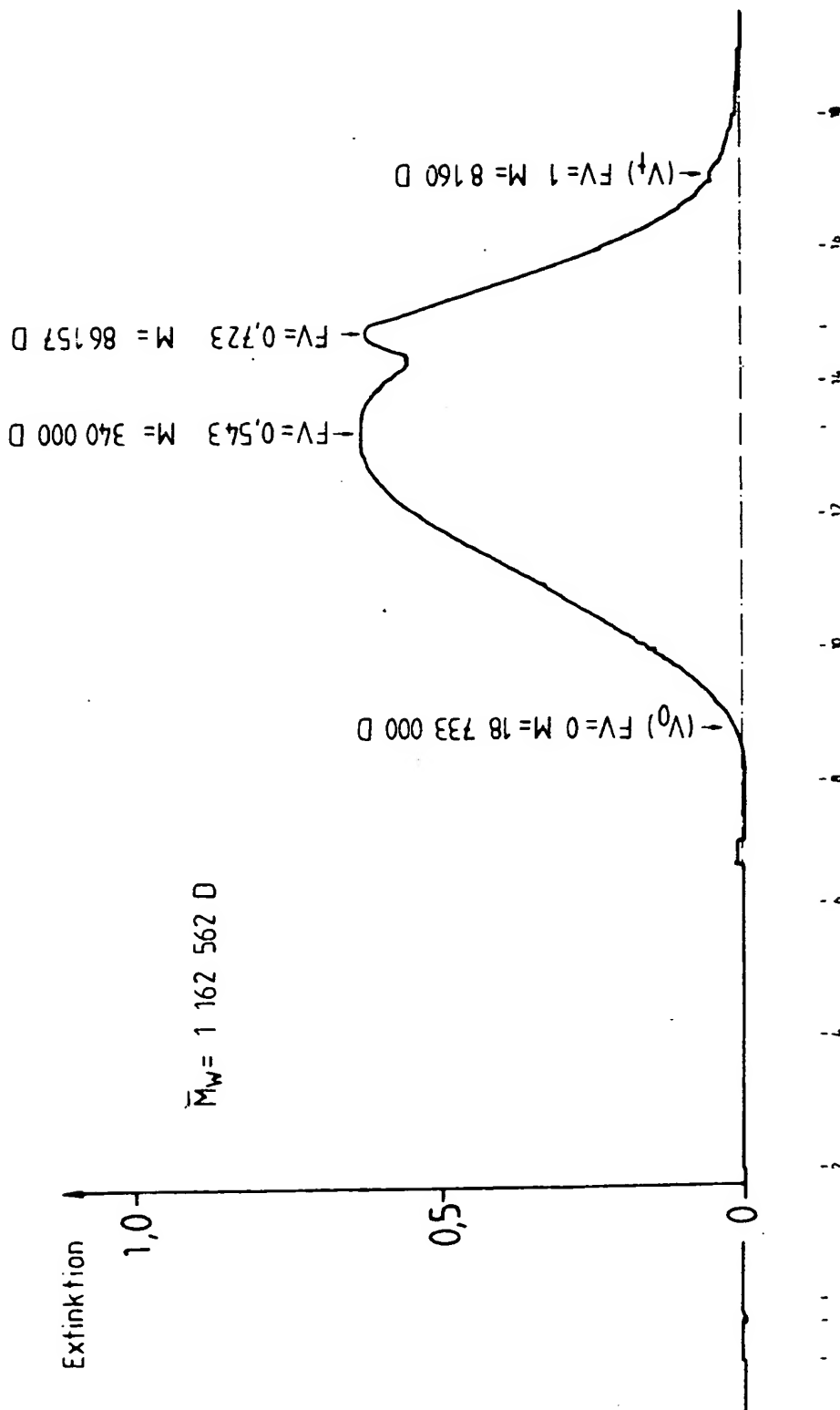
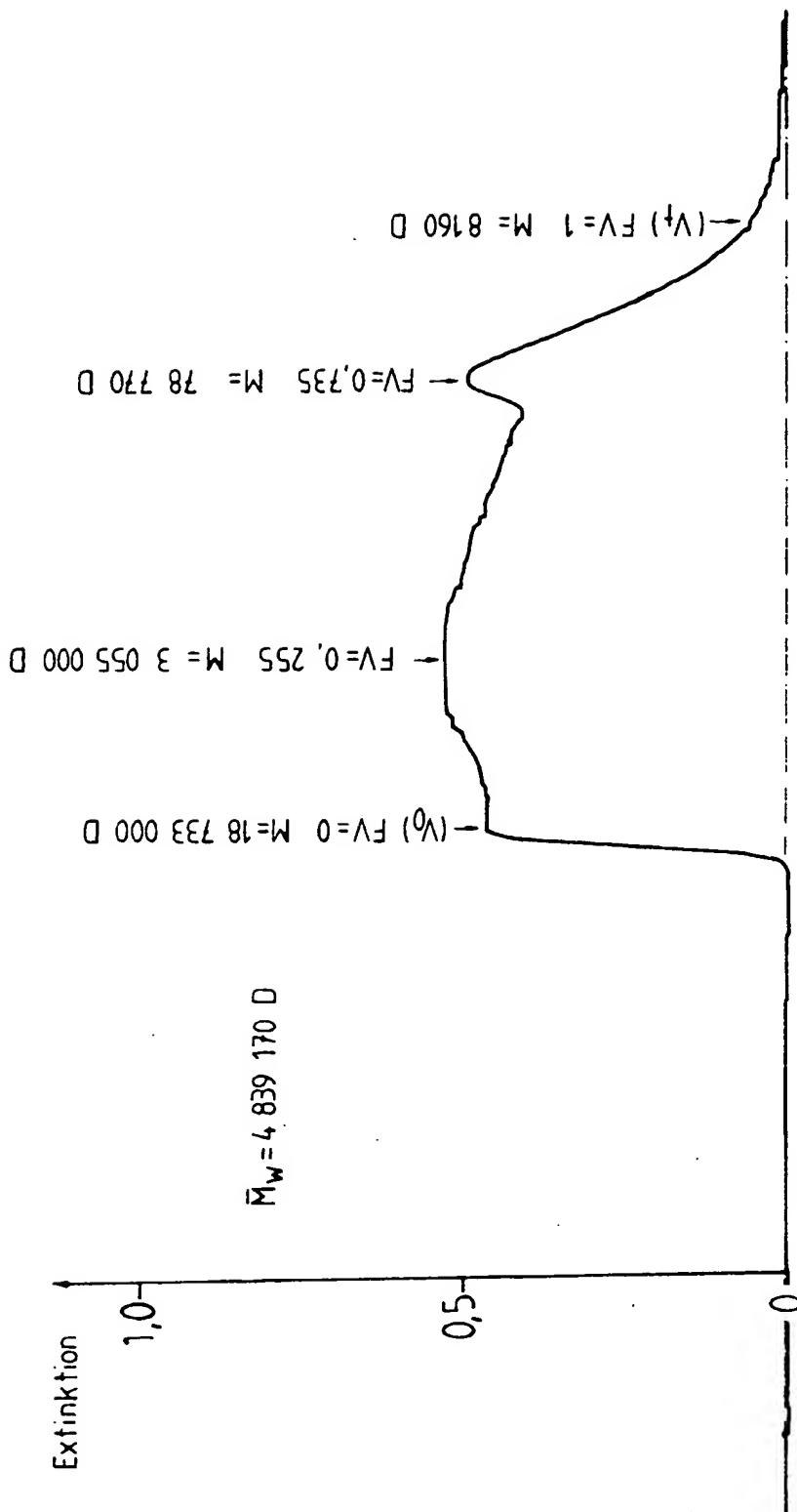


Fig. 4



Chromatogramm 5  
Fig. 5